

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11

Numéro de publication:

**0 349 428**  
**A1**

12

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21

Numéro de dépôt: **89401856.3**

51

Int. Cl.<sup>5</sup>: **A 61 K 9/51**

22

Date de dépôt: **28.06.89**

30

Priorité: **30.06.88 FR 8808871**

43

Date de publication de la demande:  
**03.01.90 Bulletin 90/01**

84

Etats contractants désignés:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

71

Demandeur: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS)  
15, Quai Anatole France  
F-75700 Paris Cedex 07 (FR)**

72

Inventeur: **Stainmesse, Serge  
8 rue Spinoza  
F-94600 Choisy le Roi (FR)**

**Fessi, Hatem  
9 rue Friant  
F-75007 Paris (FR)**

**Devissaguet, Jean-Philippe  
14 Bd d'Inkermann  
F-92200 Neuilly sur Seine (FR)**

**Puisieux, Francis  
66 rue de Strasbourg  
F-94700 Maisons-Alfort (FR)**

74

Mandataire: **Varady, Peter et al  
Cabinet Lavoix 2, Place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cedex 09 (FR)**

54

**Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une protéine, sous forme de nanoparticules.**

57

Le procédé est caractérisé selon l'invention en ce que : (1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de la protéine et éventuellement d'une substance biologiquement active dans l'eau ou dans un mélange aqueux à une température inférieure à la température de coagulation de la protéine, et pouvant être additionné d'un ou de plusieurs surfactifs, (2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou d'un mélange aqueux à une température supérieure à la température de coagulation de la protéine, pouvant contenir une substance biologiquement active et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs, (3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre dans des conditions de pH éloigné du point isoélectrique de la protéine, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanoparticules de la protéine et éventuellement de la substance biologiquement active, et (4) si l'on désire, on élimine tout ou partie de l'eau ou du mélange aqueux, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanoparticules ou à obtenir une poudre de nanoparticules.

Applications : biochimie, pharmacie, médecine, cosmétique.

**EP 0 349 428 A1**

## Description

### Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une protéine, sous forme de nanoparticules

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une protéine sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille inférieure à 500 nm (nanoparticules).

EP-A-0 275 796 a pour objet un procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille inférieure à 500 nm. (nanoparticules), caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de la substance dans un solvant ou dans un mélange de solvants, et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par un non-solvant ou un mélange de non-solvants de la substance et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs, le non-solvant ou le mélange de non-solvants de la substance étant miscible en toutes proportions au solvant ou mélange de solvants de la substance,

(3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanoparticules de la substance, et

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie du solvant ou du mélange de solvants de la substance et du non-solvant ou du mélange de non-solvants de la substance, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanoparticules ou à obtenir une poudre de nanoparticules.

La présente invention concerne une variante du procédé ci-dessus dans lequel, ladite substance est une protéine et éventuellement une substance biologiquement active, ledit solvant est l'eau ou un mélange aqueux à une température inférieure à la température de coagulation de la protéine, ledit non-solvant de la substance est l'eau à une température supérieure à la température de coagulation de la protéine et peut éventuellement contenir une substance biologiquement active, et lesdites deux phases liquides (1) et (2) sont rassemblées dans des conditions de pH éloigné du point isoélectrique de la protéine.

Ainsi, le présent procédé est caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de la protéine et éventuellement d'une substance biologiquement active dans l'eau ou dans un mélange aqueux à une température inférieure à la température de coagulation de la protéine, et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(2) on prépare une seconde phase liquide constituée essentiellement par de l'eau ou d'un mélange aqueux à une température supérieure

à la température de coagulation de la protéine, pouvant contenir une substance biologiquement active et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre dans des conditions de pH éloigné du point isoélectrique de la protéine, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanoparticules de la protéine et éventuellement de la substance biologiquement active, et

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie de l'eau ou du mélange aqueux, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanoparticules ou à obtenir une poudre de nanoparticules.

La protéine est notamment une protéine naturelle telle qu'une sérumalbumine (par exemple la sérumalbumine humaine ou bovine) ou une élastine (bovine, etc). La substance biologiquement active peut être un principe actif médicamenteux ou un précurseur médicamenteux, un réactif biologique ou un principe cosmétique. L'invention permet d'obtenir des nanoparticules de protéine seule (utilisables telles quelles) ou avec la substance biologiquement active. Il est également possible et même souhaitable en cas d'instabilité thermique, de fixer la substance biologiquement active sur les nanoparticules de protéine déjà formées.

Le solvant de la phase (1) qui est l'eau ou un mélange aqueux (par exemple de l'eau acidifiée ou basifiée) se trouve notamment à une température allant de 0° à 50°C, par exemple environ à la température ambiante.

Le non-solvant de la protéine dans la phase (2), qui est de l'eau ou un mélange aqueux (par exemple de l'eau acidifiée ou basifiée) se trouve notamment à une température allant de 80° à 100°C (sous pression atmosphérique), par exemple environ à la température d'ébullition.

Le pH du mélange des phases (1) et (2) doit être éloigné du point isoélectrique de la protéine afin d'éviter sa floculation. Cette différence de pH souhaitable est de l'ordre de 2 à 3. Les protéines naturelles ayant souvent un pH de l'ordre de 5 à 6, il est souhaitable que la solution finale ait un pH d'environ 3 ou d'environ 9. A cet effet, l'acide ou la base peut être ajouté(e) indifféremment à la phase (1) ou (2).

On entend par "agitation modérée" une légère agitation de 10 à 500 rpm, p. ex. environ 100 rpm, notamment par agitateur magnétique.

La concentration de protéine dans la phase (1) peut varier de 0,1 à 10%, préférentiellement de 0,5 à 4%.

Le rapport des volumes phase (1)/phase (2) peut varier de 0,1 à 1, préférentiellement de 0,2 à 0,6.

Finalement, la solution colloïdale de nanoparticules peut être à volonté concentrée, stérilisée, tamponnée (par exemple au pH physiologique),

lyophilisée ou réticulée.

L'invention permet d'obtenir des nanoparticules de protéine notamment de 150 à 300 nm.

Les exemples suivants illustrent l'invention :

**Exemple 1 :** Préparation de nanoparticules de sérumalbumine humaine (SAH).

Phase 1

SAH 1,0 g

Acide chlorhydrique N 0,3 g

Eau déminéralisée ou distillée à la température ambiante 100,0 g

Phase 2

Eau déminéralisée ou distillée portée à l'ébullition 180,0 g

La phase 1 est ajoutée sous agitation magnétique à la phase 2. Le milieu devient immédiatement opalescent par formation de nanoparticules de SAH. La taille moyenne des nanoparticules, mesurée dans un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer<sup>R</sup> de chez Coultronics) est de 190 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

La suspension peut être concentrée sous pression réduite au volume désiré, par exemple 100 cm<sup>3</sup>.

**Exemple 2 :** Préparation de nanoparticules de sérumalbumine humaine stériles.

On procède comme dans l'exemple 1, puis la suspension est stérilisée à l'autoclave à 134°C pendant 15 minutes. La taille moyenne des particules demeure pratiquement inchangée après stérilisation.

**Exemple 3 :** Préparation de nanoparticules de sérumalbumine humaine lyophilisées.

On procède comme dans l'exemple 2, puis la suspension stérile est lyophilisée.

L'addition d'un cryoprotecteur (maltose, tréhalose... etc) n'est pas indispensable, mais favorise la remise en suspension du lyophilisat. La taille moyenne des particules demeure inchangée après lyophilisation.

**Exemple 4 :** Préparation de nanoparticules de sérumalbumine humaine réticulées.

On procède comme dans l'exemple 1, mais en ajoutant 0,06 g d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 25% (p/v) à la phase 1. La taille moyenne des particules demeure inchangée après réticulation.

**Exemple 5 :** Préparation de nanoparticules de sérumalbumine bovine (SAB).

On procède comme dans l'exemple 1, en remplaçant la SAH par de la SAB et en remplaçant l'acide chlorhydrique normal par la même quantité de soude 0,01N. La taille moyenne des nanoparticules est de 150 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5.

Les nanoparticules de SAB peuvent être réticulées, stérilisées à l'autoclave et lyophilisées comme celles de SAH.

**Exemple 6 :** Préparation de nanoparticules d'élastine.

On procède comme dans l'exemple 1 mais en remplaçant la SAH par de l'élastine. La taille moyenne des nanoparticules est de 280 nm avec un indice moyen de dispersion de 1.

Les nanoparticules d'élastine peuvent être réticulées, stérilisées à l'autoclave et lyophilisées comme celles de SAH.

**Exemple 7 :** Adsorption d'un principe actif sur des nanoparticules protéiques.

Aux nanoparticules préparées selon l'exemple 1 (SAH) ou selon l'exemple 5 (SAB) on ajoute des quantités croissantes (de 0,25g à 2,50g) de salicylate de sodium. Le taux de fixation du salicylate de sodium sur les nanoparticules, mesuré après ultracentrifugation, est de 60% de la quantité mise en oeuvre, quelle que soit la quantité de principe actif ajouté.

**Exemple 8 :** Préparation de nanoparticules en présence d'un principe actif.

On procède selon l'exemple 1 (1g de SAH) ou selon l'exemple 5 (1g de SAB), mais en présence de 0,50g de salicylate de sodium dissous dans la phase 1. La taille moyenne des nanoparticules est de 200 nm avec un indice moyen de dispersion de 0,5. Le taux de fixation du salicylate de sodium sur les nanoparticules, mesuré après ultracentrifugation, est de 60% de la quantité mise en oeuvre.

**Exemple 9 :** Variante de l'exemple 8.

On procède selon l'exemple 8, mais le salicylate de sodium est dissous dans la phase 2. Les nanoparticules obtenues ont les mêmes caractéristiques que celles de l'exemple 8.

**Exemple 10 :** Préparation de nanoparticules protéiques de doxorubicine.

Aux nanoparticules préparées selon l'exemple 1 (SAH) ou selon l'exemple 5 (SAB) on ajoute 50 mg de chlorhydrate de doxorubicine. Le taux de fixation de la doxorubicine sur les nanoparticules, mesuré après ultracentrifugation, est de 90% de la quantité mise en oeuvre.

## Revendications

1. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une protéine sous forme de particules sphériques de type matriciel et de taille inférieure à 500 nm (nanoparticules), caractérisé en ce que :

(1) on prépare une phase liquide constituée essentiellement par une solution de la protéine et éventuellement d'une substance biologiquement active dans l'eau ou dans un mélange aqueux à une température inférieure à la température de coagulation de la protéine, et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(2) on prépare une seconde phase

liquide constituée essentiellement par de l'eau ou d'un mélange aqueux à une température supérieure à la température de coagulation de la protéine, pouvant contenir une substance biologiquement active et pouvant être additionnée d'un ou de plusieurs surfactifs,

(3) on ajoute sous agitation modérée, l'une des phases liquides obtenues sous (1) ou (2) à l'autre dans des conditions de pH éloigné du point isoélectrique de la protéine, de manière à obtenir pratiquement instantanément une suspension colloïdale de nanoparticules de la protéine et éventuellement de la substance biologiquement active, et

(4) si l'on désire, on élimine tout ou partie de l'eau ou de mélange aqueux, de manière à obtenir une suspension colloïdale de concentration voulue en nanoparticules ou à obtenir une poudre de nanoparticules.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine est une sérumalbumine.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine est une élastine.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la substance biologiquement active est un principe actif médicamenteux ou un précurseur médicamenteux, un réactif biologique ou un principe cosmétique.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la

substance biologiquement active est fixée sur les nanoparticules de protéine seule déjà formées dans l'étape (3).

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'eau ou le mélange aqueux de la phase préparée en (1) est à une température de 0° à 50° C.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'eau ou le mélange aqueux de la phase préparée en (2) est à une température de 80° à 100° C.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le pH du mélange des phases préparées en (1) et (2) est éloigné de 2 à 3 du point isoélectrique de la protéine.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la concentration de protéine dans la phase préparée en (1) est de 0,1 à 10%, préférentiellement de 0,5 à 4%.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le rapport des volumes phase préparée en (1)/phase préparée en (2) est de 0,1 à 1, préférentiellement de 0,1 à 0,6.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que dans l'étape (4) la totalité de l'eau est éliminée par lyophilisation.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les nanoparticules ont une taille d'environ 150 à 300 nm.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

4



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	PHARM. ACTA HELV., vol. 58, no. 7, 1983, pages 196-209, Zürich, CH; J. KREUTER: "Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems I: Preparation methods" * Page 206, paragraphe 3.5.2 * ---	1,2,4, 12	A 61 K 9/51
A	DE-A-1 542 261 (KREUFFEL & ESSER CO.) * Page 2, paragraphe 3; page 6, paragraphe 2; page 7, paragraphe 1 * ---	1,9,10	
A	US-A-3 137 631 (S. SOLOWAY) * Colonne 2, lignes 35-46 * -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A 61 K B 01 J
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 28-08-1989	Examineur KERRES P.M.G.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**